

**Ines Fijan**

# **Klinička primjena mjerenja hitotrioze u plazmi i suhoj kapi krvi na filter papiru**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Laboratoriju za nasljedne metaboličke bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ksenije Fumić.

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc Kseniji Fumić na prenesenom znanju te strpljenju pri izradi ovog rada.*

*Također, želim zahvaliti svim mojim prijateljima i prijateljicama na poticanju, zajedničkim kasnonoćnim učenjima i razgovorima te svim nezaboravnim trenucima koji su unijeli posebnu radost u moj studentski život i bez kojih ovo studiranje ne bi bilo zamislivo.*

*Posebno želim zahvaliti svojim roditeljima Mirni i Željku na beskrajnoj ljubavi i podršci te bratu Domagoju kao najvećem uzoru u mom životu i vjetru u leđa kada je najpotrebnije.*

## **KRATICE**

GBA =  $\beta$ -glukocerebrozidaza

TIBC = eng. total iron binding capacity = hrv. ukupni kapacitet vezanja željeza

APTV = aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

DBS = eng. dried blood spot = hrv. uzorak suhe kapi krvi na filter papiru

IR = referentni interval

SP = slijepa proba

Htc = hematokrit

L = eng. low = niska vrijednost parametra

H = eng. high = visoka vrijednost parametra

N = normalna vrijednost parametra

MS = multipla skleroza

CT = eng. chitotriosidase= hitotriozidaza

PARC = Pulmonary and Activation –Regulated Chemokine

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Nasljedni metabolički poremećaji .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Lizosomske bolesti nakupljanja.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Gaucherova bolest .....</b>	<b>2</b>
1.3.1. $\beta$ -glukocerebrozidaza .....	3
1.3.2. Tipovi Gaucherove bolesti .....	4
1.3.3. Terapija .....	4
1.3.3.1. Enzimska nadomjesna terapija.....	4
1.3.3.2. Inhibicija sinteze supstrata.....	5
1.3.3.3. Transplantacija koštane srži.....	5
<b>1.4. Biomarkeri .....</b>	<b>5</b>
1.4.1. Biomarkeri u Gaucherovoj bolesti.....	6
1.4.1.1. Hitotriozidaza.....	6
1.4.1.1.1. Sarkoidoza .....	9
1.4.1.1.2. Multipla skleroza .....	9
1.4.1.1.3. Ostala stanja.....	9
1.4.1.2. Ostali biomarkeri za Gaucherovu bolest.....	10
<b>1.5. Suha kap krvi na filter papiru .....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Načelo enzimske metode .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2. Načelo metode spektrofotometrije .....</b>	<b>14</b>
3.2.1. Spektrofotometar.....	16
<b>3.3. Oprema.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4. Mjerenje aktivnosti hitotriozidaze u plazmi.....</b>	<b>18</b>

3.5. Razvoj metode za mjerenje aktivnosti hitotriozidaze u DBS.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	23
4.1. Hitotriozidaza u plazmi .....	23
4.2. Ispitivanje optimalnih uvjeta mjerenja hitotriozidaze u DBS .....	27
4.3. Vrijednosti dobivene mjerenjem aktivnosti hitotriozidaze u DBS ...	30
4.4. Utjecaj hematokrita .....	32
5. ZAKLJUČCI .....	34
6. LITERATURA .....	35
7. SAŽETAK/ SUMMARY .....	38
Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card	

# 1. UVOD

## 1.1. Nasljedni metabolički poremećaji

Engleski liječnik, Archibald Edward Garrod, je 1909. godine u medicinu uveo pojam nasljednih metaboličkih bolesti. Opisao je kliničku sliku alkaptonurije, cistinurije, albinizma i pentozurije bez spoznaje o biokemijskoj pozadini poremećaja.

Nasljedni metabolički poremećaji su monogenske bolesti uzrokovane mutacijama jednog gena. Nasljeđivanje slijedi Mendelove zakone nasljeđivanja, autosomno ili X-vezano nasljeđivanje te recesivno ili dominantno. Kao posljedica mutacije gena dolazi do sinteze djelomično ili potpuno nefunkcionalnog enzima. To je uzrok promjena metaboličkih putova, zbog kojih može doći do nakupljanja supstrata, odnosno manjka produkta enzimske reakcije. Osim toga je moguća i aktivacija sporednih metaboličkih mehanizama koji dovode do nakupljanja nekih drugih produkata. U većini slučajeva ne postoji korelacija između genotipa i fenotipa. Zbog toga poznavanje pojedinih mutacija ne daje sigurnu ni dovoljnu informaciju o razvoju kliničke slike bolesti jer na učinak same mutaciju značajnu ulogu mogu imati i okolišni čimbenici. Nasljedni metabolički poremećaji se javljaju u najmanje 1% sve novorođenčadi te se mogu pojaviti u bilo kojem razdoblju života. Broj novootkrivenih poremećaja stalno raste, a do danas je poznato više od 570 nasljednih metaboličkih poremećaja za koje su poznati biokemijski mehanizmi nastanka koji mogu objasniti njihovu patogenezu.

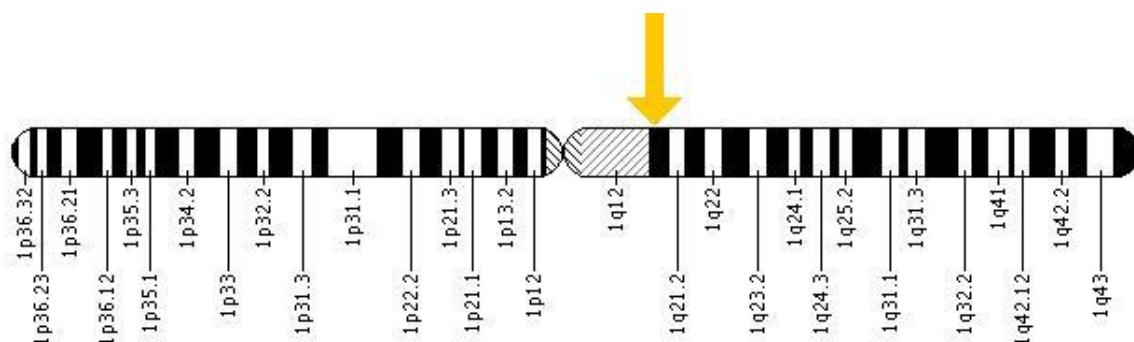
## 1.2. Lizosomske bolesti nakupljanja

Lizosomi su stanične organele obavijene membranom koje sadržavaju više od 50 različitih hidrolitičkih enzima uz pomoć kojih razgrađuju složene molekule lipide, polisaharide, proteine, nukleinske kiseline i dr. Većina lizosomskih enzima su hidrolaze koje su aktivne pri kiselom pH. Na taj način se osigurava da se prilikom oštećenja membrane lizosoma i izlaska enzima u citoplazmu u kojoj prevladava neutralni pH neće dogoditi razgradnja citosolnog sadržaja. Lizosomi su morfološki međusobno različiti jer mogu poprimit oblik ovisno o materijalu koji razgrađuju (Cooper, 2010). Mutacije gena koji kodiraju za sintezu lizosomskih enzima dovode do lizosomskih bolesti nakupljanja. Do danas je poznato više od 55 poremećaja iz te skupine nasljednih metaboličkih bolesti (Fumić i sur., 2004). Bolesti se razlikuju ovisno o biokemijskoj vrsti nakupljenog supstrata ( mukopolisaharidoze,

glikogenoze, oligosaharidoze, sfingolipidoze i dr.). Jedna od najčešćih lizosomskih bolesti nakupljanja je sfingolipidoza Gaucherova bolest.

### 1.3. Gaucherova bolest

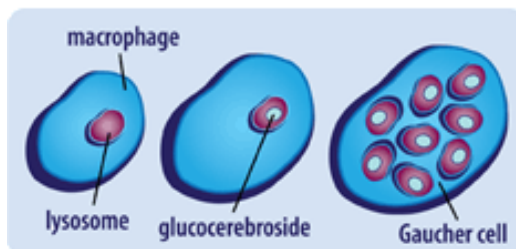
Gaucherova bolest javlja se s visokom učestalošću u ukupnoj populaciji od prosječno 1:57,000 novorođene djece. U određenim etničkim skupinama, poput Ashkenazi Židova pojavnost bolesti je izrazito česta (Rodrigues i sur., 2009). To je sfingolipidoza koju uzrokuje manjak lizosomskog enzima  $\beta$ -glukocerebrozidaze (GBA). Manjak uzrokuje neka od mutacija u genu za  $\beta$ -glukocerebrozidazu (GBA gen). GBA gen se sastoji od 10 introna i 11 eksona te se nalazi na kromosomu 1q22 (Slika 1).



**Slika 1.** Prikaz GBA gena na dugom kraku kromosoma 1, žuta strelica označava položaj gena (preuzeto [http://wiki.ggc.usg.edu/wiki/File:Ch\\_1.jpeg](http://wiki.ggc.usg.edu/wiki/File:Ch_1.jpeg))

Kao posljedica manjka  $\beta$ -glukocerebrozidaze dolazi do nakupljanja nerazgrađenog supstrata, (glukozilceramida) prvenstveno u lizosomima makrofaga. Na taj se način stvaraju specifični makrofazi koje poznajemo kao Gaucherove stanice (Slika 2). Najčešće ih nalazimo u jetri, slezeni i koštanoj srži. Prisutnost ovih stanica u tkivima i organima uzrokuje pojavu nekih od simptoma koji su zajednički svim Gaucherovim pacijentima. Klinička slika, kao sekundarna patologija bolesti, podrazumijeva hepatomegaliju, splenomegaliju, pancitopeniju (anemija i trombocitopenija) te koštanu patologiju. Patološke manifestacije na kostima uključuju osteonekrozu, infiltraciju koštane srži, osteopeniju, osteoporozu, zastoj rasta, bol u kostima, prijelome i koštane krize. Gaucherova bolest je povezana i s poremećajima imunoglobulina, kao što su multipli mijelom, hiperimunoglobulinemija te poliklonska i monoklonska gamatopatija. U djece bolest može rezultirati zakašnjelim pubertetom te zastojem u razvoju, a sama pojava simptoma u ranoj dobi ukazuje na teži oblik bolesti. Tijek Gaucherove bolesti je najčešće progresivan uz mogućnost nastanka trajnih komplikacija pojedinih organa kroz

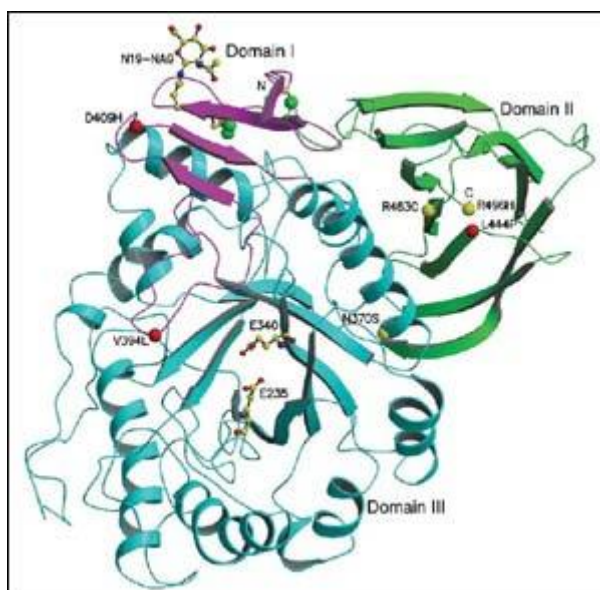
određeni vremenski period. Kumulativno sve kliničke manifestacije imaju izrazito negativan utjecaj na kvalitetu života pojedinaca, a sve razlike u kliničkim manifestacijama govore o kojem tipu Gaucherove bolesti se radi.



**Slika 2.** Ilustracija formiranja Gaucherovih stanica ( preuzeto s [http://wiki.ggc.usg.edu/wiki/File:Gaucher\\_cell.gif](http://wiki.ggc.usg.edu/wiki/File:Gaucher_cell.gif))

### 1.3.1. $\beta$ -glukocerebrozidaza

Enzim  $\beta$ -glukocerebrozidaza sastoji se od tri velike domene (Slika 3) te pripada skupini hidrolaza, što znači da katalizira reakcije hidrolize kemijskih veza. U reakciji koju katalizira  $\beta$ -glukocerebrozidaza, dolazi do hidrolize glukocerebrozida u glukozu i ceramid. Mjerenje aktivnosti ovog enzima (u suhoj kapi krvi na filter papiru, homogenatu leukocita, homogenatu kultiviranih kožnih fibroblasta) neophodno je za postavljanje konačne dijagnoze Gaucherove bolesti.



**Slika 3.** Prikaz 3D strukture enzima  $\beta$ -glukocerebrozidaze



### 1.3.2. Tipovi Gaucherove bolesti

Gaucherova bolest ima tri tipa koji se međusobno razlikuju po tijeku bolesti.

Tip I je najučestaliji, zahvaća 90% od ukupnog broja bolesnika. Klinička slika se javlja od kasnog djetinjstva pa do odrasle dobi. To je ne-neuropatskom oblik bolesti, a klinička slika uključuje hepatosplenomegaliju, bolesti kostiju poput osteolitičnih promjena s prijelomima, zatim kašnjenje puberteta i zaostanak u rastu. Na rendgenskim slikama se mogu uočiti promjene korteksa te spljošteni krajevi dugih kostiju.

Tip II je najrjeđi tip Gaucherove bolesti koji je neuropatskog karaktera. Simptomi se javljaju u ranom dojenačkom periodu i podrazumijevaju progresivno neurološko propadanje, poput konvulzija i rigidnosti. Smrt nastupa najčešće do druge godine života.

Tip III je subakutni neuropatski tip koji je po svojoj incidenciji, kliničkoj slici te ostatnoj enzimskoj aktivnosti između prvog i drugog tipa bolesti. Bolest se javlja u djetinjstvu te se može podijeliti na tri podskupine (IIIa, IIIb i IIIc) ovisno o kliničkim znakovima. Podskupina IIIa uključuje progresivnu demenciju i ataksiju. Kod pacijenata podskupine IIIb zahvaćene su kosti i unutarnji organi, dok se kod podskupine IIIc javlja supranuklearna paraliza sa zamućenjem rožnice.

### 1.3.3. Terapija

#### 1.3.3.1. Enzimska nadomjesna terapija

Danas je liječenje Gaucherove bolesti moguće uz nekoliko oblika enzimske nadomjesne terapije. Jedan od prvih koji se počeo koristiti prije dvadeset godina je Imigluceraza (Cerezyme®) koja hidrolizira glukozilceramid i na taj način sprječava sekundarnu patologiju bolesti. Imigluceraza je modificirani oblik ljudske kisele  $\beta$ -glukozidaze koja se proizvodi tehnologijom rekombinantne DNA na staničnoj kulturi sisavaca, odnosno jajnika kineskog hrčka uz modifikaciju manozom kako bi ciljano djelovala na makrofage. Ovaj lijek je indiciran kao dugotrajna enzimska nadomjesna terapija u bolesnika s potvrđenom dijagnozom ne-neuropatske (tip I) ili kronične neuropatske (tip III) Gaucherove bolesti koji pokazuju klinički značajne manifestacije bolesti koje nisu neurološke naravi. Budući da se radi o multisistemskoj i heterogenoj bolesti, dozu je potrebno prilagoditi svakom pojedinom pacijentu na temelju njegovog kliničkog stanja. Jednom kada se postigne dobar terapijski odgovor, učestalost primjene lijeka se može prilagoditi na način da se održava takvo stanje s ciljem dodatnog poboljšanja onih kliničkih parametara koji se prvotnim doziranjem nisu

potpuno normalizirali. Do sada su se neke kombinacije doziranja lijeka pokazale učinkovitima. Primjerice uz početnu dozu od 60 U/kg tjelesne težine zabilježeno je da dolazi do poboljšanja hematoloških i visceralnih parametara (koncentracija hemoglobina, broj trombocita, volumen jetre i slezene) unutar 6 mjeseci terapije, a nastavak primjene terapije je doveo do poboljšanja koštanih manifestacija bolesti ili je zaustavio napredovanje. Uzimanjem manjih doza od 15 U/kg tjelesne težine, jednom svaka 2 tjedna, dolazi do poboljšanja hematoloških parametara i organomegalije, ali nema pozitivnog učinka na koštane tegobe. Uobičajena primjena infuzije je jedanput u 2 tjedna ( [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

### 1.3.3.2. Inhibicija sinteze supstrata

U fazi istraživanja su i lijekovi čiji mehanizam uključuje inhibiciju sinteze supstrata, a mogu se uzimati peroralno. Cilj ovakvog pristupa liječenju je smanjiti nakupljanje glukocerebrozida, na način da se smanji njegova biosinteza. Dosadašnja istraživanja ukazuju na potrebu poboljšanja učinkovitosti i sigurnosti lijeka kako bi njegova primjena zaživjela (Mrsić, 2005).

### 1.3.3.3. Transplantacija koštane srži

Zbog značajnih rizika koje nosi ova metoda (visoka smrtnost, mogućnost imunološke transplantacijske reakcije odbacivanja), njena primjena je usko ograničena samo na bolesnike tipa III bolesti u kombinaciji s enzimskom nadomjesnom terapijom (Mrsić, 2005).

## 1.4. Biomarkeri

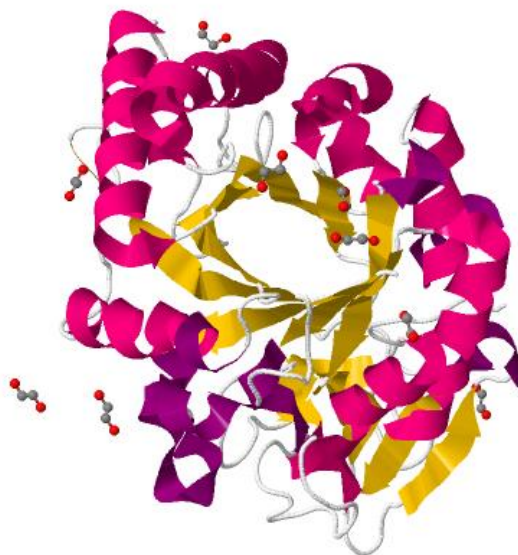
Biomarker je metabolit specifičan za svaki pojedini biološki sustav te predstavlja obilježje određenog biološkog stanja. Kada je određeni biološki marker prisutan u abnormalnim koncentracijama u tjelesnim tekućinama ukazuje na prisutnost određene bolesti (Daintith, 2008). Klinički primjenjiv biomarker ima određene karakteristike koje ga čine prikladnim za dijagnostiku i praćenje tijeka bolesti. Karakteristike idealnog biomarkera su mogućnost jednostavnog kvantitativnog mjerenja u dostupnim kliničkim materijalima te njegova mjerenja moraju biti pouzdana, brza, reproducibilna i jeftina. Idealni biomarker odražava promjene na svim zahvaćenim organima te se njegova ekspresija specifično mijenja (povisuje ili snižava) u određenoj bolesti, dok nepovezana patološka stanja nemaju utjecaj na njega. Nakon početka liječenja koncentracija idealnog biomarkera u tjelesnim tekućinama korelira s poboljšanjem kliničke slike, a promjene odražavaju potrebu za promjenom doze lijeka

(Bobillo Lobato, 2016). Danas je poznat široki raspon biomarkera koji se koriste kod velikog broja bolesti, a neki od njih su korisni i kod praćenja stanja Gaucherovih bolesnika.

### 1.4.1. Biomarkeri u Gaucherovoj bolesti

#### 1.4.1.1. Hitotriozidaza

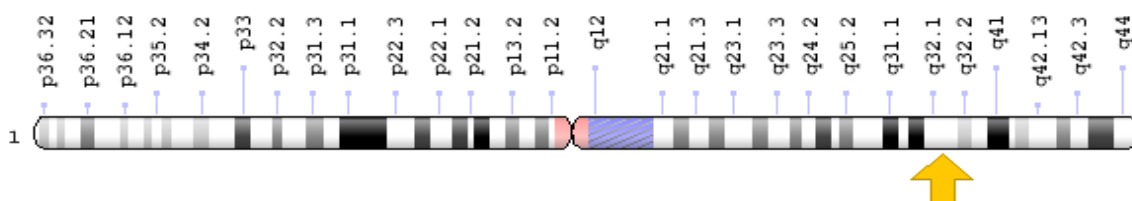
Enzim hitotriozidaza je biomarker koji se pokazao klinički prihvatljiv za Gaucherovu bolest. Hitotriozidaza je prvi puta izolirana iz slezene pacijenta koji je imao Gaucherovu bolest tipa I. Tada su pročišćene dvije različite forme enzima. Jedna forma je bio protein veličine 39 kD, a druga forma je bio protein veličine 50 kD. Sekvenciranjem peptida otkriveno je da obje izoforme imaju identičnu N-terminulanu sekvencu te jednaku sekvencu unutrašnjih aminokiselina. Provođenjem eksperimenata na staničnoj kulturi makrofaga utvrđeno je da se hitotriozidaza inicijalno sintetizira kao protein veličine 50 kD koji se u velikoj mjeri izlučuje. Sekretorni oblik enzima za razliku od 30kD hitotriozidaze sadrži O-vezane oligosaharide te uz katalitičku domenu sadrži i dodatnu C-terminalnu hitin vezujuću domenu, dok 30kD forma ne sadrži nikakve oligosaharide. Otprilike jedna trećina 50kD izoforme enzima se transportira u lizosome gdje se procesom proteolize uklanja C-terminalna sekvencu i na taj način nastaje 39 kD forma.



**Slika 4.** Prikaz strukture hitotriozidaze ( preuzeto s

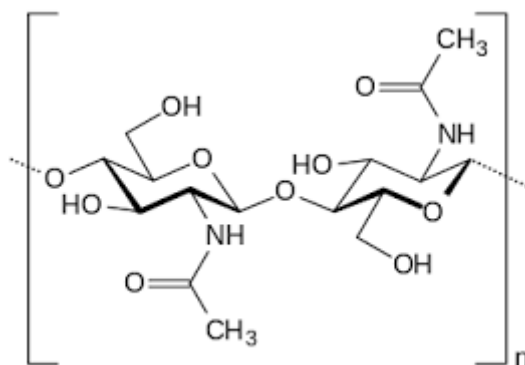
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1GUV&bionumber=1>)

Dok se promotori i drugi faktori koji reguliraju transkripciju hitotriozidaze još uvijek istražuju, in situ hibridizacijom je utvrđeno da se gen za hitotriozidazu (CHIT1) nalazi se na dugom kraku kromosoma 1, na lokusu 1q31-32 ( Slika 5). Gen je veličine 20 kb te se sastoji od 12 eksona (Aerts, 1999). Glasnička RNA koja kodira za sintezu hitotriozidaze eksprimirana je samo u specifično aktiviranim makrofagima te u kasnom stadiju diferencijacije monocita. Ljudski makrofagi mogu sintetizirati funkcionalnu hitotriozidazu, enzim koji je izrazito konzerviran te čija je ekspresija snažno regulirana (www. ghr.nlm.nih.gov).



**Slika 5.** Prikaz CHIT1 gena smještenog na lokusu 1q31-32 (preuzeto s <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CHIT1#conditions>)

Kloniranjem cDNA hitotriozidaze iz knjižnice gena makrofaga utvrđeno je da je hitotriozidaza izrazito homologna s hitinazom iz bakterija, biljaka, nematoda i nekih kukaca. Hitotriozidaza pripada skupini hidrolaza te može hidrolizirati hitin. Hitin (Slika 6) je dugolančani polimer N-acetilglukozamina, derivata glukoze. Poslije celuloze, hitin je drugi najčešći biopolimer u prirodi. Glavni je sastojak stjenke beskralježnjaka, a oklopu kukaca daje savitljivost te je teško razgradiv. Iako se prije vjerovalo da kod kralježnjaka nije prisutan takav tip hidrolaze koji može razgraditi hitin, upravo se hitotriozidaza smatra ljudskim analogom hitinaza. Fiziološka uloga hitotriozidaze nije još potpuno poznata, ali činjenica da se enzima eksprimira u fagocitima i da je sličan hitinazama koje u biljkama imaju obrambenu ulogu u borbi protiv patogena koji sadrže hitin, primjerice gljivica, smatra se da bi sličnu ulogu u organizmu mogla imati i hitotriozidaza. Potencijalna antifungalna aktivnost hitotriozidaze trenutno se još istražuje (Aerts, 1999).



**Slika 6.** Prikaz strukture hitina (preuzeto s <https://bs.wikipedia.org/wiki/Hitin>)

U plazmi Gaucherovih bolesnika zamijećena je povećana razgradnja supstrata 4-metil-umbeliferil-hitotriozida, za koju je odgovorna hitotriozidaza. Izolacija Gaucherovih stanica nakon splenektomije je pokazala da su one izvor visoke koncentracije hitotriozidaze u plazmi. In situ hibridizacijom uspješno su detektirane velike količine RNA hitotriozidaze u skladišnim stanicama bezobzira na njihovu lokaciju u organizmu. Smatra se da aktivnost hitotriozidaze u plazmi odražava broj Gaucherovih stanica prisutnih u svim organima, dok aktivnost enzima u plazmi ne korelira s kliničkom slikom bolesti. Aktivnosti hitotriozidaze u serumu bolesnika s uznapredovalom Gaucherovom bolešću mogu biti i do nekoliko desetaka tisuća U/ml. Nažalost, hitotriozidaza ne zadovoljava kriterije idealnog biološkog markera. Umjereno povišene aktivnosti u plazmi izmjerene su i kod nekih drugih lizosomskih bolesti nakupljanja (sarkoidozi, visceralne leishmaniozi, multiploj sklerozi i dr.). Mjerenje aktivnosti hitotriozidaze u plazmi Gaucherovih bolesnika je najkorisnije pri praćenju pacijenata na enzimskoj nadomjesnoj terapiji. Smanjenje aktivnosti hitotriozidaze u plazmi ukazuje na uspješnost terapije primijenjenom dozom. Studije su pokazale da je izrazito veliko sniženje aktivnosti enzima povezano s primjenom velikih doza enzimske terapije, a povišene vrijednosti enzima ukazuju na potrebe korekcije doze terapije radi stabiliziranja bolesti.

Od sveukupne populacije 5-6 % ljudi ima duplikaciju od 24 para baza u eksonu 10 CHIT gena, koja onemogućuje stvaranje aktivnog enzima. Riječ je o polimorfizmu G102S zbog kojeg neki ljudi imaju smanjenu aktivnost hitotriozidaze ili ju uopće nemaju. Kod takvih slučajeva bolesnika s Gaucherovom bolesti, mjerenje aktivnosti hitotriozidaze dalo bi lažno negativne rezultate. Slična je situacija i s heterozigotima koji imaju 50% aktivnosti enzima. Kod takvih pacijenata postoji mogućnost mjerenja CCL18 kemokina tj. PARC-a. Koncentracija CCL18 kemokina je u simptomatskih Gaucherovih bolesnika povišena 10-50 puta.

#### 1.4.1.1.1. Značajnost hitotriozidaze u drugim bolestima

##### 1.4.1.1.1.1. Sarkoidoza

Sarkoidoza je kronična upalna bolest u kojoj nastaju granulomi u mnogim organima. Bolest je karakterizirana aktivacijom limfocita i makrofaga te njihovom migracijom u zahvaćene organe. Klinička slika bolesti je nepredvidiva te se može prezentirati kao akutna, subakutna i kronična. Zbog brojnih fenotipa bolesti teško je pronaći idealni biomarker za sarkoidozu. Aktivnost angiotenzim konvertirajućeg enzima se već dugo koristi kao biomarker u ovoj bolesti. Međutim, praćenjem pacijenata zamijećena je povišena aktivnost hitotriozidaze u serumu bolesnika, a smatra se da ona potječe upravo iz aktiviranih makrofaga. Dosadašnje studije potvrđuju da je hitotriozidaza klinički najkorisniji biomarker za praćenje tijeka bolesti (Brunner, 2007; Bargagli, 2013) .

##### 1.4.1.1.1.2. Multipla skleroza

Multipla skleroza (MS) je kronična upalna bolest centralnog živčanog sustava (CNS). U multiploj sklerozi autoimuni antigen specifični odgovor se smatra temeljem patofiziologije ove bolesti. Međutim, studije tvrde da u većini lezijskih subtipova multiple skleroze dominira urođeni imuno odgovor koji podrazumijeva infiltraciju makrofagima. Tvari koje oslobađaju makrofagi poput TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, metaloproteinaza, dušikovog oksida i reaktivnih kisikovih spojeva pokazuju korelaciju s kliničkom aktivnosti multiple skleroze, ali njihovo određivanje nije moguće u kliničkoj rutini. Stoga se hitotriozidaza kao marker aktivacije makrofaga te njezina povišena intratekalna vrijednost pokazala mogućim prognostičkim markerom. Iako primarno aktivnost hitotriozidaze potječe od makrofaga, mikroglija bi također mogla biti inducirana na proizvodnju tog enzima u trenutku njihove postupne fenotipske transformacije u aktivirane makrofage. Prema literaturnim izvorima vrijednost aktivnosti hitotriozidaze je povišena u krvi i cerebrospinalnoj tekućini pacijenata s MS te korelira s opsegom oštećenja CNS-a (Baron, 2007; Sotgiu, 2006.) .

##### 1.4.1.1.1.3. Ostala stanja

Ostala patološka stanja poput talasemije, malarije, ateroskleroze te Alzheimerove bolesti se prema literaturnim navodima povezuju s povišenom aktivnosti hitotriozidaze u plazmi bolesnika. Također se navodi i povezanost starenja i povišene aktivnosti hitotriozidaze. Smatra se da kontinuirana aktivacija makrofaga, zbog uklanjanja oksidativnih produkata koji su karakteristični za starenje, predstavlja izvor povišene vrijednosti hitotriozidaze (Baron, 2007).

#### 1.4.1.2. Ostali biomarkeri za Gaucherovu bolest

U Gaucheovoj bolesti korisno je uz hitotriozidazu paralelno pratiti još neke dodatne laboratorijske parametre. Primjerice, serumsko željezo, feritin i TIBC se određuju u svrhu otkrivanja pridruženog nedostatka željeza ili prekomjerenog nakupljanja željeza zbog ponovljenih transfuzija koncentrata eritrocita. Ukupni i direktni bilirubin, ukupni proteini i albumini testiraju se s razlogom praćenja funkcije jetre. Kaogulacijski parametri poput APTV i protrombinskog vremena određuju se zbog otkrivanja poremećaja zgrušavanja povezanih s bolešću jetre. Također je moguć i nedostatak faktora IX, X i XI. Konačno, elektroforeza serumskih proteina i imuno elektroforeza rade se u svrhu otkrivanja monoklonske gamatopatije koja može biti udružena s Gaucheovom bolesti (Mrsić, 2005)

### 1.5. Suha kap krvi na filter papiru

Uzorak suhe kapi krvi na filter papiru danas se koristi kao biološki uzorak za mjerenje velikog broja analita, te ima primjenu u toksikologiji, pri novorođenačkom probiru i u predkliničkim farmakokinetičkim studijama (Slika 7). Takav uzorak ima veliki broj prednosti u odnosu na uzorak seruma ili plazme. Primjerice, manji volumen krvi prilikom uzorkovanja i lakše uzorkovanje budući da se radi o punoj krvi koja može biti uzorkovana iz prsta, pete ili uške pacijenta. Uzorak suhe kapi krvi na filter papiru je puno praktičniji za transport do nekog drugog laboratorija koji nije u blizini mjesta uzimanja uzorka. Stabilnost uzorka te njegova pohrana su manje zahtjevnije. Uzorak se može čuvati na sobnoj temperaturi i ostaje stabilan kroz duže vrijeme nego plazma koja se strogo mora čuvati na  $+4^{\circ}\text{C}$  24h ili na  $-20^{\circ}\text{C}$  kako bi se sačuvala njena stabilnost. Nadalje, za određivanje analita iz suhe kapi krvi na filter papiru potrebni su manji volumeni reagensa. Također, prednost je u tome što je moguće veći broj uzoraka određivati istovremeno, uz primjenu odgovarajućeg materijala, te sama izvedba metode kraće traje.

Initials and Family Name<sup>1</sup>  
 Date of Birth<sup>2</sup>  
 Sex<sup>3</sup> M F Date of Collection<sup>4</sup>  
 Patient Identification Number<sup>5</sup>  
 Requesting Physician<sup>6</sup>  
 Hospital Name<sup>7</sup>  
 Address<sup>8</sup>  
 Country<sup>9</sup>  
 Telephone<sup>10</sup>  
 E-mail<sup>11</sup>  
 Test Requested:<sup>12</sup> ☐ Fabry Disease ☐ Pompe Disease ☐ Gaucher Disease ☐ MPS I  
 Top Copy: Requesting Physician<sup>13</sup>

Watman 903  
 08007874  
 Do not touch sample area  
 Do not use if damaged

**Slika 7.** Prikaz kartice na kojoj je *Watman 903* filter papir s kružićima predviđenim za kapanje krvi. 60  $\mu$ L krvi će u potpunosti ispuniti naznačeni kružić na filter papiru (ako je vrijednost Htc u uzorku 40-50%).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Mjerenje aktivnosti hitotriozidaze u plazmi koristi se kao biomarker u otkrivanju mogućih Gaucherovih bolesnika. Međutim, značajno veći klinički značaj hitotirozidaza ima u praćenju tijeka liječenja bolesnika na skupoj enzimskoj nadomjesnoj terapiji. Ovisno o aktivnosti hitotirozidaze bolesnicima se prilagođuje doza lijeka. Pokazalo se da je hitotriozidaza klinički najprihvatljiviji biomarker i za praćenje tijeka sarkoidoze.

Za bolesnike koji moraju kontrolirati aktivnost hitotriozidaze bilo bi jednostavnije mjeriti aktivnost iz uzorka suhe kapi krvi na filter papiru. Takav uzorak ima osnovnu prednost u tome što se jednostavno može poslati poštom do laboratorija. Zbog toga je osnovni cilj rada bio pokušati razviti metodu mjerenja aktivnosti hitotriozidaze iz uzorka suhe kapi krvi na filter papiru i usporediti dobivene vrijednosti s mjerenjima u plazmi.

Jedan od poznatih problema mjerenja aktivnosti lizosomskih enzima iz uzorka suhe kapi krvi na filter papiru je utjecaj hematokrita. Zbog toga smo htjeli vidjeti kakav je utjecaj razlike u hematokritu na izmjerenu aktivnost hitotriozidaze.

### 3. MATERIJALI I METODE

U ovom diplomskom radu koristili su se uzorci EDTA krvi 84 bolnička pacijenta preostali nakon redovne hematološke obrade, kao i uzorci poznatih bolesnika s Gaucherovom bolešću tipa 1 koji su na enzimskoj nadomjesnoj terapiji (n=23) i bolesnika s Gaucherovom bolešću tipa 2 (n=3) i tipa 3 (n=2).

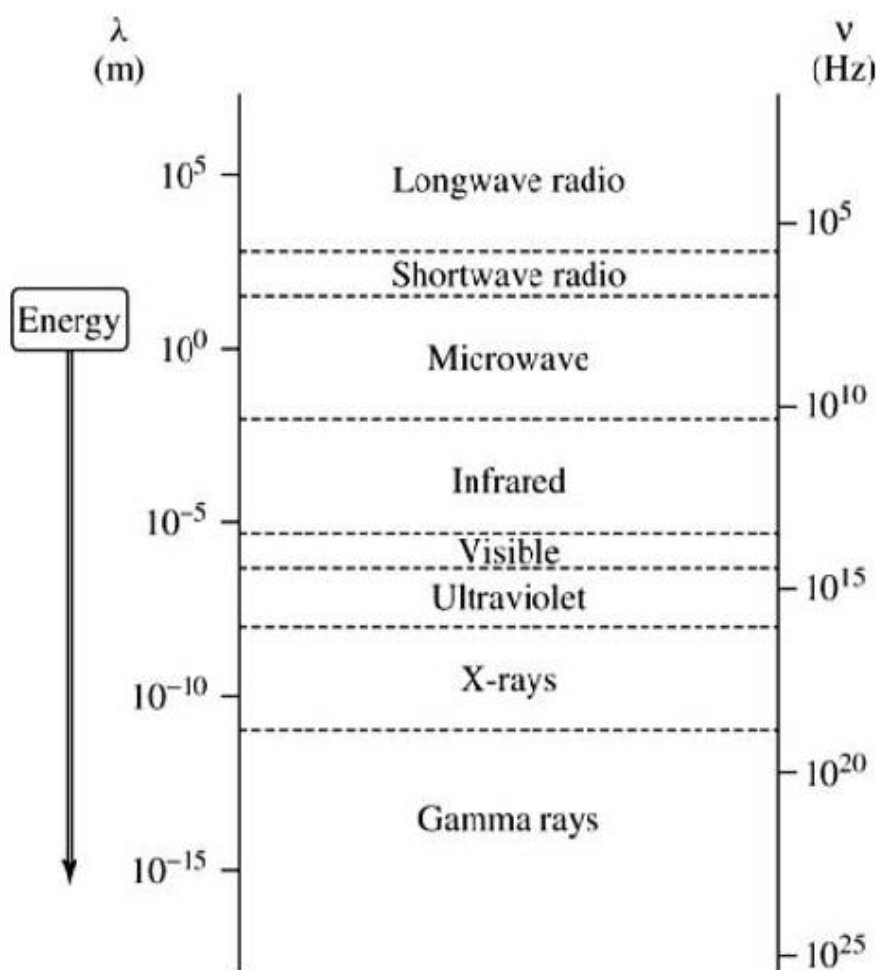
Uzorci za mjerenje hitotriozidaze u plazmi pripremljeni su iz uzoraka EDTA krvi koji su se lagano promiješali i dvije kapi pune krvi (60 $\mu$ L) su se nakapale u označene kružice filter papira (Slika 7). Ostatak uzorka prenio se u ependorficu i centrifugirao 10 minuta na 14rpm pri 10 °C u *Eppendorf 5415R* centrifugi. Plazma se prenijela u drugu ependorficu i koristila za daljnja mjerenja hitotriozidaze. Kao kontrolni uzorak koristio se uzorak poola plazme zdravih osoba.

#### 3.1. Načelo enzimske metode

Metoda mjerenja aktivnosti hitotriozidaze pripada skupini diskontinuiranih metoda određivanja enzima. Načelo diskontinuiranih metoda jest da se uzorku koji sadrži analit od interesa, u našem slučaju enzim hitotriozidazu, doda sintetski supstrat, te se nakon određenog vremena inkubacije reakcija prekine i zatim se određuje koncentracija produkta nastalog u reakcijskoj smjesi. Enzim hitotriozidaza katalizira razgradnju sintetskog supstrata 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-N,N,N-triacetilhitotriozida na produkte  $\beta$ -D-N,N,N-triacetilhitotriozid i 4-metilumbeliferol (4-MUF) čija je fluorescencija u alkalnoj sredini proporcionalna aktivnosti enzima hitotriozidaze. Reakcija se odvija u kiselim uvjetima pri pH=5,2 te dodatkom glicinskog pufera dolazi do promjene pH reakcijske smjese. Stvaranjem alkalnih uvjeta prekida se enzimska reakcija. Do takve promjene dolazi jer su enzimi biološke molekule koje su po svojoj strukturi proteini. Vezna i katalitička mjesta enzima čine bočni ogranci animokiselina koji se promjenom pH medija ioniziraju te zbog toga već pri malom pomaku od optimalnog pH za pojedini enzim dolazi do smanjene aktivnosti enzima. Na taj način moguće je manipulirati odvijanjem enzimske reakcije. Prilikom provođenja diskontinuiranih tehnika određivanja enzima treba voditi računa da se prekidom reakcije ne mijenja i struktura nastalih produkata kako se ne bi dobili lažno negativni rezultati te treba utvrditi da je analit koji mjerimo dovoljno stabilan za čekanje mjerenja. Nakon prekida reakcije promjenom pH provodi se mjerenje fluorescencije produkta reakcije spektrofotometrijom.

### 3.2. Načelo metode spektrofлуorimetrije

Sve spektroskopske metode temelje se na interakciji tvari s elektromagnetskim zračenjem.



**Slika 8.** Prikaz elektromagnetskog spektra (preuzeto iz literaturnog navoda Sheehan D. Physical Biochemistry)

Emisija energije odnosno elektromagnetskog zračenja uvijek je povezana s prelaskom tvari iz višeg u niže energetske stanje.

Razlika između dva energetska stanja jednaka je razlici energija između ta dva stanja:

$$\Delta E = E_{\text{konačnostańje}} - E_{\text{početnostańje}}$$

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda}$$

$h$  = Planckova konstanta;  $6,626 \times 10^{-34} \text{Js}$

$c$  = brzina svjetlosti;  $3 \times 10^8 \text{ms}^{-1}$

$\lambda$  = valna duljina svjetlosti;  $m$

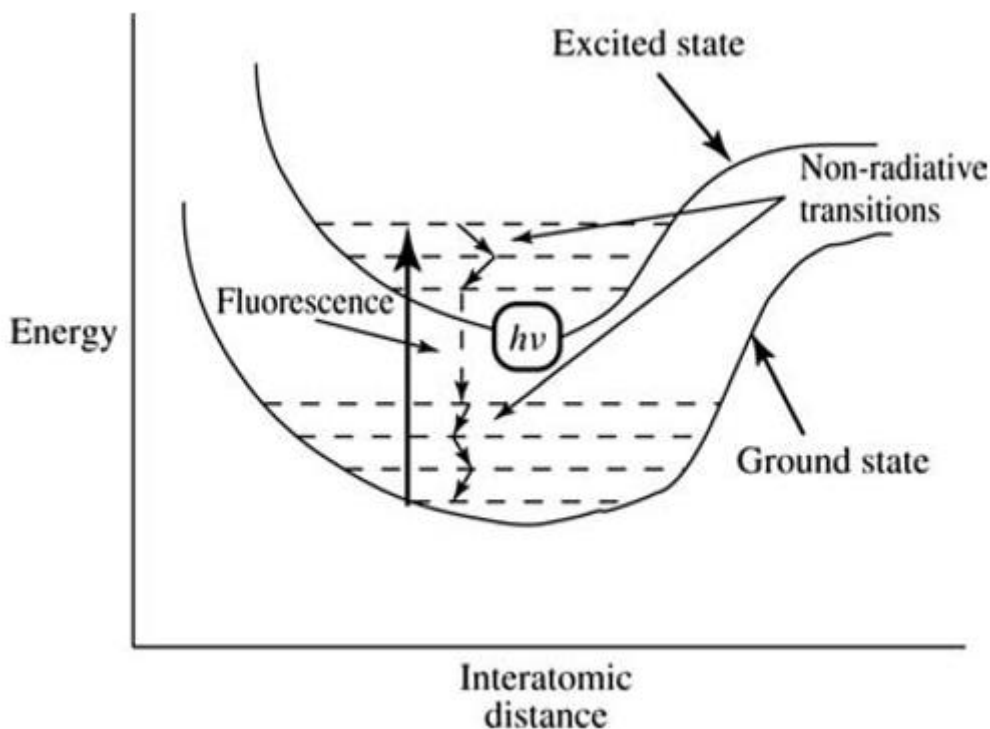
Pritom velike promjene energije odgovaraju malim valnim duljinama, a male promjene energije odgovaraju velikim valnim duljinama. Spektroskopske metode se dijele na apsorpcijsku i emisijsku spektroskopiju, a spetrofluorimetrija spada u emisijsku spektroskopiju. Fluorescencijom se naziva zračenje veće valne duljine koje emitira molekula nakon što je apsorbirala određenu energiju zračenja. Određena tvar se pobudi pomoću svjetlosti određene valne duljine ( $\lambda$  ekscitacijske svjetlosti), dio te energije se u pobuđenom stanju djelomično rasipa, a vraćanjem u osnovno stanje emitira se svjetlost nove valne duljine ( $\lambda$  emisijske svjetlosti) te manje energije od one koja se apsorbirala i tu pojavu zovemo Stokesovim pomakom.

Fluorescencija je proces koji se odvija u tri stupnja (Slika 9):

- 1) Ekscitacija
- 2) Trajanje pobuđenog stanja
- 3) Emisija fluorescencije

Za ekscitaciju potreban je neki vanjski izvor zračenja, primjerice lampa ili laseri, nakon što fluorofora apsorbira zračenje ona prelazi u pobuđeno elektronsko singletno stanje. Trajanje pobuđenog stanja je 1-10 nsec. Za vrijeme trajanja pobuđenog stanja dolazi do konformacijskih promjena molekule koja fluorescira te do mnoštva interakcija s ostalim molekulama iz okoliša. Zbog toga se energija pobuđenog elektronskog singletnog stanja djelomično rasipa za vrijeme trajanja pobuđenog stanja te zbog toga prelazi u relaksirano singletno stanje od kojeg potječe emisija fluorescencije. Posljednja faza u procesu fluorescencije je emisija fluorescencije, dakle emitira se foton energije  $h\nu_{\text{emisije}}$  i na taj način se pobuđena molekula vraća u osnovno stanje. Zbog opisanog rasipanja energije tijekom

trajanja pobuđenog stanja energija emitiranog fotona je manja od apsorbirane energije, a njezina valna duljina je veća.

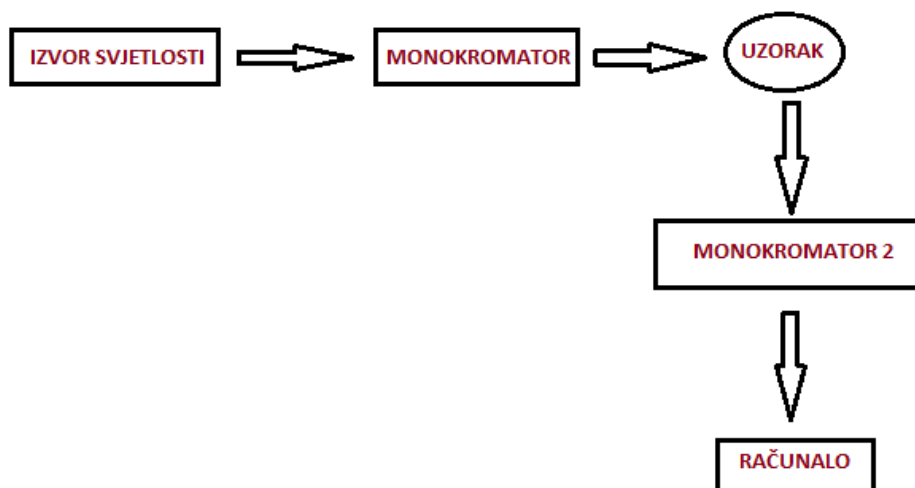


**Slika 9.** Na grafu je prikazan proces fluorescencije (preuzeto iz literaturnog navoda Sheehan D.Physical Biochemistry, str. 66)

### 3.2.1. Spektrofluorimetar

Svaki spektrofluorimetar građena je od izvora svjetlosti, dva monokromatora, postolja za uzorak i računala. Shema analizatora prikazana je na Slici 10. Izvor svjetlosti najčešće je lampa ili laser, koji je potreban za pobuđivanje molekule fluorofore. Monokromator je optički uređaj koji propušta samo jednu valnu duljinu svjetlosti koja pada na njega. On se najčešće sastoji od optičke prizme, optičke rešetke ili optičkog filtra, a biranjem kuta upadne zrake svjetlosti na npr. optički filter monokromatora može se odabrati točno određena valna duljina koju će monokromator propustiti na naš uzorak. Budući da je nama poznata valna duljina pri kojoj naš analit od interesa ima maksimum apsorpcije, možemo podesiti uvjete koji nama najbolje odgovaraju za određeni slučaj. Drugi monokromator nam je potreban kako bismo uklonili potencijalne interferencije. Naime u našem uzorku uz analit prisutne su i neke druge molekule koje mogu fluorescirati, stoga kako bismo uklonili sve potencijalne smetnje i kako bismo se osigurali da ćemo mjeriti samo svjetlost one valne duljine za koju očekujemo da će

ju emitirati naš analit od interesa, postavljamo još jedan monokromator koji će nam omogućiti da propuštamo samo jednu valnu duljinu koju naš analit emitira. Uz pomoć računala i detektora, registriraju se emisijski fotoni koji se pretvaraju u izlazni signal koji se na računalu može analizirati.



**Slika 10.** Shema analizatora spektrofluorimetra

### 3.3. Oprema

- Spektrofluorimetar (*Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer*), (Slika 11)
- vorteks
- vodena kupelj s tresalicom (*Memmert*)
- automatske pipete (*Eppendorf*; volumeni 5 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)
- crne nesterline mikrotitarske pločice (*6610022500, 10/pk; Agilent Technologies*)
- ručna bušilica za uzorke promjera 3mm skalpel
- centrifuga (*Eppendorf 5415R*)

### 3.4.Mjerenje aktivnosti hitotriozidaze u plazmi

Za mjerenje aktivnosti hitotriozidaze u plazmi korištena je „*in house*“ metoda.

Reagensi:

- 1) Supstrat: 22  $\mu\text{mol}$  / L 4-metilumbeliferol- $\beta$ -D-N,N,N-triacetilhitotriozid; dobiven otapanjem 0,0173 g supstrata u 1000 mL McIlvanovog citrat-fosfatnog pufera
- 2) Glicinski pufer (pH=10,4), 0,2 M; pripravljen je otapanjem 7,4 g glicina i 4,0 g NaOH u 500 ml redestilirane vode, nakon pripreve potrebno je još provjeriti pH pufera.
- 3) Fiziološka otopina

Postupak:

Pipetirati 5  $\mu\text{L}$  uzorka plazme u epruvetu te dodati 100  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljenog supstrata (reagens 1). Potom se reakcijska smjesa dobro promiješa na vortexu. Nakon toga se epruvete začepi te se inkubiraju 60 min u vodenoj kupelji na 37 °C. Nakon završetka inkubacije, reakcija se prekida dodatkom 600  $\mu\text{L}$  glicinskog pufera (reagens 2). Iz tako dobivenog uzorka mjeri se fluorescencija na spektrofotometru *Varian Cary Eclipse*.

Uvjeti na spektrofotometru::

Valna duljina ekscitacije (nm) : 355,07

Valna duljina emisije (nm) : 460,00

Ex. Slit Width (nm) : 10

Em. Slit Width (nm) : 5

PMT Voltage(V) : 440

Ekscitacijski filter: Auto

Emisijski filter: 360-1100 nm

Podešavanjem vrijednosti voltaže možemo utjecati na osjetljivost mjerenja. Što je voltaža veća to je veća i osjetljivost mjerenja fluorescencije. Širina ekscitacijskog i emisijskog proreza govori o veličini prozorčića u kojem se odvija mjerenje fluorescencije, odnosno o načinu na koji se mjeri fluorescencija.

Za nativne uzorke u kojima otklon fluorescencije premašuje 100, potrebno je napraviti razrjeđenje uzorka zbog prelaženja linearnosti metode. Razrjeđenje se radi na način da se 10 µL uzorka plazme pomiješa s fiziološkom otopinom (reagens 3). Za razrjeđenje 1:5 dodaje se 40 µL fiziološke otopine, ako u tom razrjeđenju otklon fluorescencije opet prelazi 100, potrebno je napraviti razrjeđenje 1:10 koje se dobiva dodatkom 10 µL plazme i 90 µL fiziološke otopine. Također ako i u razrjeđenju 1:10 otklon fluorescencije prelazi 100, radi se daljnje razrjeđenje; 1:20 u koje je uz 10 µL plazme potrebno dodati 190 µL fiziološke otopine. Svako razrjeđenje se dobro promiješa na vortexu, te se u daljnji postupak uzima 5 µL razrjeđenja kojemu se potom doda 100 µL supstrata i daljnji postupak je isti kao i za nativni uzorak.

Nakon izmjerenih fluorescencija za svaki uzorak slijedi izračunavanje aktivnosti enzima za svaku pojedinu vrijednost fluorescencije prema sljedećoj jednadžbi:

$$konc. enzima[mU/ml] = \frac{Fl. uzorka \times FAKTOR^*}{5}$$

$$*FAKTOR = \frac{10 \mu l \times 100 \mu mol/L}{180 \times 60} = 0,09$$

Da bismo rezultat izrazili u µmol/L/h, vrijednost dobivena gornjom jednadžbom treba se korigirati:

$$konc. enzima[mU/ml] \times 60 = \mu mol / L / h$$

Izračunavanje aktivnosti enzima u uzorcima za koje je fluorescencija mjerena u pripadajućim razrjeđenjima:

$$konc. enzima[mU/ml] = \frac{Fl. uzorka \times FAKTOR^*}{5} \times razrjeđenje^*$$

$$* FAKTOR = 0,09$$

\* razrjeđenje:

5; za razrjeđenje 1:5

10; za razrjeđenje 1:10

20; za razrjeđenje 1:20



Biološki referentni interval za aktivnosti hitotriozidaze u serumu ili plazmi iznosi 0 – 250  $\mu\text{mol/L/h}$

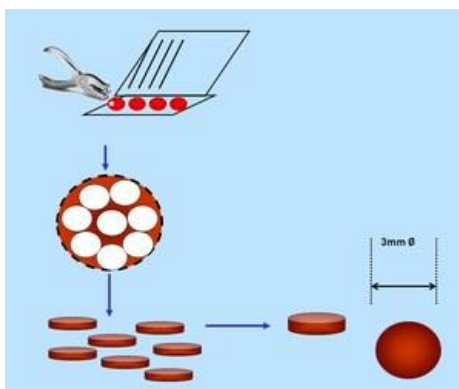


**Slika 11.** Prikaz *Varian Cary Eclipse* spektrofлуорimetra ( slika preuzeta s izvora <https://www.labx.com/item/varian-cary-eclipse-fluorescence-spectrophotometer/LV35861130>)

### 3.5. Razvoj metode za mjerenje aktivnosti hitotriozidaze u DBS

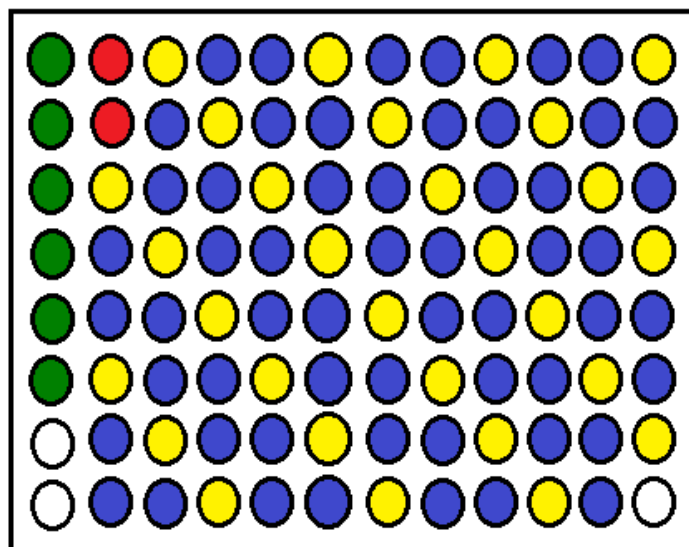
Osnovne pretpostavke kod svih drugih metoda za mjerenje aktivnosti lizosomskih enzima iz uzorka suhe kapi krvi su da u isječku od 3 mm (Filtar papira kvalitete *Watman 903*) ima oko 20 000 leukocita, 1,5  $\mu$ l eritrocita i 1,5  $\mu$ l plazme uz hematokrit 40-50%. U razvoju „*in house*“ metode krenulo se prema do sada dostupnim publikacijama (Civallero, 2006; Goldim, 2012; Chamoles, 2002).

Iz prethodno pripremljenih uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru, izrezani su isječki od 3 mm posebnim ručnim bušačem (Slika 12).



**Slika 12.** Prikaz bušenja uzorka suhe kapi krvi na filter papiru

Svaki isječak se postavlja u posebnu jažicu na mikrotitarskoj pločici prema shemi prikazanoj na Slici 13.



**Slika 13.** Shema pipetiranja na mikrotitarskoj pločici

Zeleni kružići predstavljaju jažice u kojima se nalaze standardi. Crveni kružići predstavljaju jažice u kojima se nalazi kontrola u duplikatu. Plavi kružići označavaju jažice u kojima se nalaze uzorci u kojima ispitujemo analit, također u duplikatu, a žuti kružići su slijepe probe za svaki zasebni uzorak uključujući i kontrolni, dok su bijeli kružići ostali prazni na mikrotitarskoj pločici. Kao kontrolni uzorak koristio se pool pune krvi zdrave osobe s vrijednostima hitotriozidaze u plazmi unutar referentnih intervala.

Svaka ispitivana reakcijska smjesa, osim uzorka suhe kapi krvi na filter papiru sadržavala je različite koncentracije i/ili volumene :

- 1) pufera
- 2) supstrata 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-N,N,N-triacetilhitotriozida
- 3) glicinskog pufera

Nakon dodavanja svih navedenih komponenti mikrotitarska pločica s uzorcima se inkubirala 30 minuta na 37 °C u vodenoj kupelji s tresalicom. Nakon završetka inkubacije dodavao se glicinski pufer za prekid reakcije.

Slijepa proba prije inkubacije sadržavala je uzorak i pufer, a nakon inkubacije slijepoj probi se prvo dodavao glicinski pufer, a tek na kraju supstrat kako bi se izjednačili volumeni u svim jažicama.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Hitotriozidaza u plazmi

Za mjerenje hitotriozidaze u plazmi nije dostupan komercijalni reagens. Svi laboratoriji koriste svoje „*in house*“ spektrofotometrijske metode. Jedna od loših strana takvih metoda je mali raspon linearnosti, pa su potrebne ručne dilucije uzorka. Takav način rada zahtijeva dosta pipetiranja, a to je potencijalni uzrok predanalitičkih grešaka. Zbog toga je preporuka pratiti tijek liječenja bolesnika uvijek u istom laboratoriju (Hematol, 2013).

**Tablica 1.** Prikaz izmjerenih fluoescencija u uzorcima plazme 84 bolnička pacijenta te izračunate aktivnosti enzima

Broj uzorka	$\bar{x}$ fluor. nativnog uzorka plazme u duplikatu	Fluor. razrjeđenja 1:5 uzorka plazme	Fluor. razrjeđenja 1:10 ili 1:20* uzorka plazme	CT u nativnom uzorku plazme/ $\mu\text{mol/L/h}$	CT u razrjeđenju 1:5 uzorka plazme / $\mu\text{mol/L/h}$	CT u razrjeđenju 1:10 ili 1:20* uzorka plazme / $\mu\text{mol/L/h}$
1	53,660			57,95		
2	28,815			31,12		
3	48,920			52,83		
4	72,267			78,05		
5	12,451			13,45		
6	31,907			34,46		
7	125,492	56,000		/	302,40	
8	41,389			44,70		
9	115,901	50,000		/	270,00	
10	40,175			43,39		
11	50,316			54,34		
12	81,949			88,50		
13	55,300			59,72		
14	14,515			15,68		
15	96,756			104,50		
16	52,532			56,73		
17	60,893			65,76		
18	30,986			33,46		
19	50,557			54,60		
20	66,559			71,88		
21	16,827			18,17		
22	50,528			54,57		

23	100,709	19,000		/	102,60
24	49,442			53,40	
25	92,676			100,09	
26	247,948	76,000		/	410,40
27	39,345			42,49	
28	57,959			62,60	
29	120,643	23,000		/	124,20
30	18,648			20,12	
31	42,074			45,44	
32	53,113			57,36	
33	35,363			38,19	
34	19,483			21,04	
35	20,690			22,35	
36	85,121			91,93	
37	62,729			67,75	
38	50,902			54,97	
39	39,611			42,78	
40	24,886			26,88	
41	50,320			54,35	
42	90,573			97,82	
43	58,148			62,80	
44	43,435			46,91	
45	37,966			41,00	
46	1,244			1,34	
47	111,615	28,000		/	151,20
48	24,482			26,44	
49	52,745			56,96	
50	184,702	56,000		/	302,40
51	75,004			81,00	
52	32,483			35,08	
53	18,417			19,89	
54	15,425			16,66	
55	26,670			28,80	
56	58,363			63,03	
57	77,382			83,57	
58	240,376	165,705	84,318	/	/ 910,63
59	202,275	66,689		/	360,12
60	20,793			22,46	
61	17,970			19,41	
62	14,536			15,70	
63	201,240	79,723		/	430,50
64	29,779			32,16	
65	138,960	28,389		/	153,30
66	18,421			19,89	
67	39,468			42,63	
68	13,937			15,05	
69	228,508	124,018	62,713	/	/ 677,30
70	256,133	101,249	47,895	/	/ 517,27

71	241,829	104,410	49,458	/	/	534,15
72	95,485			103,12		
73	123,403	36,811		/	198,78	
74	26,649			28,78		
75	159,628	48,069		/	249,57	
76	241,973	162,517	152,119 82,081*	/	/	/
77	57,779			62,40		1772,95*
78	24,012			25,93		
79	121,102	29,443		/	158,99	
80	40,417			43,65		
81	47,416			51,21		
82	133,404	35,464		/	191,51	
83	23,624			25,51		
84	4,155			4,49		

Izmjerene vrijednosti kontrolnih uzorka hitotriozidaze u plazmi odgovaraju referentnim rasponima u literaturi (Elmonem, 2014).

Od ukupno 84 uzorka plazme bolničkih pacijenata, u njih 11 ( uzorci br.7, 9, 26, 50, 58, 59, 63, 69, 70, 71 i 76) je izmjerena vrlo blago povišena aktivnosti hitotriozidaze, dok je u preostalim uzorcima aktivnost hitotriozidaze u plazmi unutar referentnog intervala.

**Tablica 2.**Prikaz uzoraka pacijenata s povišenom aktivnosti hitotriozidaze i njihova dijagnoza

Broj uzorka	Aktivnost CT	Dijagnoza
7	302,40	Akutno odbacivanje bubrega
9	270,00	Nestabilna angina pectoris
26	410,40	Srčana bolest
50	302,40	Zloćudna novotvorina frontalnog režnja
58	910,63	Sarkoidoza
59	360,12	Sarkoidoza pluća sa sarkoidozom limfnih čvoreva
63	430,50	Sarkoizoda
69	677,30	Nejasna plućna bolest
70	517,27	Povećani limfni čvorovi
71	534,15	Sarkoidoza sa sarkoidozom limfnih čvorova
76	1772,95	Sarkoizoda

Uzorci s povišenom aktivnosti enzima izdvojeni su u Tablici 2 s pripadajućom dijagnozom pacijenta. Naknadnim uvidom u uputne dijagnoze ovih bolesnika uočeno je da najveći broj ispitivanih pacijenata s povećanom aktivnosti hitotriozidaze boluje od sarkoidoze. To potvrđuje značaj hitotriozidaze kao biomarkera u toj bolesti.

**Tablica 3.** Aktivnosti hitotriozidaze u bolesnika s Gaucherovom bolešću

Broj uzorka	Inicijali pacijenta	Dijagnoza	CT (mU/mL) u vrijeme (godine) postavljanja dijagnoze	CT (mU/mL) u plazmi na terapiji, 2016. godine
1	P.M.	GD tip 1	2002.- 14 246	1 657
2	V.P.	GD tip 1	2002.- 14 649	1 234
3	B.K.	GD tip 1	2002.- 4 488	876
4	S.R.	GD tip 1	2002.- 24 732	513
5	T.D.	GD tip 1	2003.->50000	616
6	T.S.	GD tip 1	2004.- >60000	232
7	S.E.	GD tip 1	2005.- 24 174	545
8	L.I.	GD tip 1	2005.- >60000	550
9	P.A.	GD tip 1	2002.- 32 457	2 554
10	V.R.	GD tip 1	2002.- 20 400	976
11	K.B.	GD tip 1	2002.- 26 400	4 719
12	K.N.	GD tip 1	2005.- >60000	2 371
13	R.M.M.	GD tip 2	2010. - 3 500	1 590
14	K.I.	GD tip 3	2010.- 853	57
15	K.L.	GD tip 3	2008.->12 000	35
16	V.N.	GD tip 1	2002.->60 000	2 577
17	V.M.	GD tip 1	2003.->50000	1 208
18	C.T.Đ.	GD tip 1	2006.-25 080	769
19	L.M.	GD tip 1	2008.-37 164	1 232
20	M.D.	GD tip 1	2008.- 3 900	62
21	A.R.	GD tip 1	2009.- >50000	934
22	I.A.	GD tip 1	2009.- 10 920	80
23	W.D.	GD tip 1	2011.- 4 839	454
24	*S.E.	GD tip 1	2009.- 6	/
25	J.V.	GD tip 1	2009.-12 300	1 657
26	*S.P.	GD tip 1	2009.- 2	/
27	K.P.	GD tip 2	2016.- 5 976	2 100
28	J.K.	GD tip 2	2016.-5 800	1 987

Uspješnom primjenom enzimске nadomjesne terapije smatra se ako se postigne pad aktivnosti hitotriozidaze u plazmi ispod 2 000 mU/mL. Kod većine prikazanih pacijenata u Tablici 3 vidi se značajan pad aktivnosti enzima unutar razdoblja od ustanovljene dijagnoze bolesti do kontrole provedene u 2016. godini što nam pokazuje da je hitotriozidaza dobar biomarker u praćenju terapije Gaucherovih bolesnika te da je primijenjena „in house“ metoda zadovoljavajuća. Početne aktivnosti hitotriozidaze kod većine pacijenata s Gaucherovom bolesti tipa 1, unutar 7 godina primjene terapije, spustile su se na terapijski prihvatljivu vrijednost. Za pacijente s Gaucherovom bolesti tipa 3 klinički znakovi bolesti javljaju se u ranom životnom periodu, stoga je početna aktivnost hitotriozidaze u tih pacijenata niža od aktivnosti hitotriozidaze u pacijenata s Gaucherovom bolesti tipa 1. Pacijenti (\*) kod kojih je početna aktivnost hitotriozidaze bila izrazito niska spadaju u skupinu od 6% populacije s polimorfizmom G102S i kod njih praćenje tijekom liječenja je moguće jedino uz korištenje CCL18 biomarkera.

## 4.2. Ispitivanje optimalnih uvjeta mjerenja hitotriozidaze u DBS

**Tablica 4.** Varijante uvjeta mjerenja prema referencama (Civallero, 2006; Goldim, 2012; Chamoles, 2002)

Slučaj	Uvjeti mjerenja	Reagensi	Komentar
1	Valna duljina ekscitacije (nm) : 360,00 Valna duljina emisije (nm) : 450,00 Ex. Slit Width (nm) : 10 Round Em. Slit Width (nm) : 10 PMT Voltage (V) : 850 Ekscitacijski filter: Auto Emisijski filter: Open	Pufer 1: 80 µl natrij acetat; 0,25 M Supstrat: 80µl; 22 M Pufer 2: 210 µl glicinski za prekid reakcije  Uzorak: promjer 3 mm	Preniska izmjerena vrijednost fluorescencije ( 14, 251) za uzorak normalne aktivnosti enzima u uzorku plazme
2	Valna duljina ekscitacije (nm) : 360,00 Valna duljina emisije (nm) : 450,00 Ex. Slit Width (nm) : 10 Round Em. Slit Width (nm) : 10 PMT Voltage (V) : 850 Ekscitacijski filter: Auto Emisijski filter: Open	Pufer 1: 90 µl natrij acetat; 0,25 M Supstrat: 70µl; 22 M Pufer 2: 210 µl glicinski za prekid reakcije  Uzorak: promjer 3 mm	Preniska izmjerena vrijednost fluorescencije (18,585) za uzorak normalne aktivnosti enzima u uzorku plazme



3	Valna duljina ekscitacije (nm) : 365,00 Valna duljina emisije (nm) : 450,00 Ex. Slit Width (nm) : 10 Em. Slit Width (nm) : 10 PMT Voltage (V) : 890 Ekscitacijski filter: Auto Emisijski filter: Open	Pufer 1: 30 µl citrat fosfatni pufer Supstrat: 60µl; 22 M Pufer 2: 250 µl glicinski za prekid reakcije  + 30 µl natrij tauroholata  Uzorak: promjer 3 mm	Nemjerljiva vrijednost fluorescencije (1000; oznaka: over range) za uzorak normalne aktivnosti enzima u uzorku plazme
4	Valna duljina ekscitacije (nm) : 365,00 Valna duljina emisije (nm) : 485,00 Ex. Slit Width (nm) : 10 Round Em. Slit Width (nm) : 10 PMT Voltage (V) : 680 Ekscitacijski filter: Auto Emisijski filter: Open	Pufer 1: 30 µl citrat fosfatni pufer Supstrat: 60µl; 22 M Pufer 2: 250 µl glicinski za prekid reakcije  + 30 µl natrij tauroholata  Uzorak: promjer 3 mm	Preniska izmjerena vrijednost fluorescencije (18) za uzorak normalne aktivnosti enzima u uzorku plazme; usporedba sa slučajem 3 (jednaki volumeni reagensa): promjenom s 890 na 680 Vsmanjila se osjetljivost
5	Valna duljina ekscitacije (nm) : 365,00 Valna duljina emisije (nm) : 450,00 Ex. Slit Width (nm) : 10 Round Em. Slit Width (nm) : 20 PMT Voltage (V) : 890 Ekscitacijski filter: Auto Emisijski filter: Open	Pufer 1: 30 µl citrat fosfatni pufer Supstrat: 60µl; 22 M Pufer 2: 250 µl glicinski za prekid reakcije  + 30 µl natrij tauroholata  Uzorak: promjer 3 mm	Previsoka izmjerena vrijednost fluorescencije (1000; oznaka: over range) za uzorak normalne aktivnosti enzima u uzorku plazme; usporedba sa slučajem 3 (jednaki volumeni reagensa) promjena Ex. Slit s 10 na 10 Round nije imala znatan učinak na mjerenje fluor.
6	Valna duljina ekscitacije (nm) : 360,00 Valna duljina emisije (nm) : 450,00 Ex. Slit Width (nm) : 10 Round Em. Slit Width (nm) : 10 PMT Voltage (V) : 890 Ekscitacijski filter: Auto Emisijski filter: Open	Pufer 1: 20 µl citrat fosfatni pufer Supstrat: 80µl; 22 M Pufer 2: 250 µl glicinski za prekid reakcije  + 20 µl natrij tauroholata  Uzorak: promjer 3 mm	Izmjerena vrijednost fluorescencije (170,145) previsoka za uzorak normalne aktivnosti enzima, takva vrijednost očekivana je kod uzorka s povišenom aktivnosti enzima

7	Valna duljina ekscitacije (nm) : 365,00 Valna duljina emisije (nm) : 450,00 Ex. Slit Width (nm) : 10 Round Em. Slit Width (nm) : 20 PMT Voltage (V) : 950 Ekscitacijski filter: Auto Emisijski filter: Open	Pufer 1: 40 µl natrij acetat; 0,25 M Supstrat: 40 µl; 0,19M Pufer 2: 290 µl glicinski za prekid reakcije Uzorak: promjer 3mm	Previsoka izmjerena vrijednost fluorescencije ( 405,209) za uzorak normalne aktivnosti enzima u uzorku plazme
8	Valna duljina ekscitacije (nm) : 365,00 Valna duljina emisije (nm) : 450,00 Ex. Slit Width (nm) : 10 Round Em. Slit Width (nm) : 20 PMT Voltage (V) : Medium Ekscitacijski filter: Auto Emisijski filter: Open	Pufer 1: 16 µl natrij acetat; 0,25 M Supstrat: 16 µl; 0,19M Pufer 2: 240 µl glicinski za prekid reakcije Uzorak: polovica uzorka promjera 3 mm	Zadovoljavajuća vrijednost izmjerene fluorescencije (41,164) za uzorak normalne aktivnosti enzima

Tablica 4. prikazuje različite slučajeve podešavanja uvjeta mjerenja fluorescencije, koncentracije, kao i pH reagensa te njihove volumene koji su pritom korišteni. Za svaku kombinaciju reagensa ispitane su različite kombinacije njihovih volumena na istom uzorku za svaki navedeni slučaj. Slučajevi 3-6 u kojima se koristio citrat fosfatni pufer i 22M supstrat nisu davali očekivana mjerenja. Mijenjanjem uvjeta mjerenja, dobivene fluorescencije bile su ili preniske (slučaj 4) od očekivanih ili previsoke (slučaj 3, 5 i 6), što ukazuje da odabir primijenjenih reagensa nije bio odgovarajući. Također, dodatak natrij tauroholata pokazao se nepotrebnim, jer nisu zamijećeni bolji rezultati u odnosu na slučajeve gdje se natrij tauroholat nije koristio. Primjenom natrij acetatnog pufera i 22 M supstrata ( slučaj 1 i 2), također nisu dobivene primjerene vrijednosti za ispitivani uzorak. Izmjerena je preniska fluorescencija od one koja se očekivala. U 7. slučaju primijenili su se volumeni i koncentracije supstrata i natrij acetatnog pufera prema protokolu u publiciranoj literaturi (Civallero, 2006.), međutim dobivena mjerenja nisu zadovoljila očekivanja. Konačno, slučaj 8 prikazuje uvjete i reagense pod kojima se mjerila aktivnost enzima i u svim preostalim ispitivanim uzorcima, jer je testno mjerenje zadovoljilo očekivanja. Prema navodu publicirane reference (Pereirade Souza Goldim, 2012), volumeni supstrata i natrij acetatnog pufera primijenjeni u slučaju 7 podijeljeni su s 2,5, a uzorak DBS je sa skalpelom prerezan na pola. Pokazalo se da niža koncentracija supstrata te manja količina uzorka pogoduju dobivanju zadovoljavajućih rezultata za testni uzorak.

### 4.3. Vrijednosti dobivene mjerenjem aktivnosti hitotriozidaze u DBS

**Tablica 5.** Prikazuje izmjerene otklone fluorescencije za uzorke DBS te pripadajuće vrijednosti hematokrita za svaki pojedini uzorak, mjerene prema slučaju 8 (Pereirade Souza Goldim, 2012) iz Tablice 3.

Broj uzorka	$\bar{x}$ fluor. nativnog uzorka DBS - fluor. SP	Htc/ L/L	Oznaka za vrijednost Htc
1	76,198	0,257	L
2	21,863	0,256	L
3	10,650	0,289	L
4	76,424	0,238	L
5	56,899	0,266	L
6	134,828	0,242	L
*7	67,125	0,177	L
8	56,553	0,284	L
*9	43,604	0,279	L
10	74,581	0,278	L
11	22,844	0,251	L
12	77,934	0,355	L
13	12,449	0,320	L
14	16,960	0,327	L
15	44,136	0,249	L
16	76,737	0,370	N
17	59,635	0,254	L
18	54,680	0,243	L
19	21,764	0,31	L
20	36,368	0,259	L
21	21,291	0,342	L
21	23,596	0,259	L
23	58,121	0,286	L
24	17,294	0,315	L
25	54,559	0,273	L
*26	177,267	0,233	L
27	62,565	0,255	L
28	33,143	0,300	L
29	52,035	0,292	L
30	50,245	0,369	N
31	29,946	0,367	N
32	54,635	0,389	N
33	94,642	0,266	L

34	15,909	0,257	N
35	50,215	0,307	L
36	80,869	0,276	L
37	104,467	0,281	L
38	33,863	0,395	N
39	36,473	0,263	L
40	52,282	0,355	L
41	82,315	0,258	L
42	53,024	0,276	L
43	85,847	0,283	L
44	23,647	0,231	L
45	72,687	0,247	L
46	26,128	0,367	N
47	62,658	0,486	N
48	32,638	0,377	N
49	28,306	0,390	N
*50	58,183	0,382	N
51	64,462	0,384	N
52	43,657	0,415	N
53	10,813	0,444	N
54	30,763	0,478	N
55	54,644	0,399	N
56	85,316	0,362	N
57	36,005	0,390	N
*58	53,531	0,410	N
*59	38,475	0,454	N
60	5,806	0,462	N
61	7,483	0,403	N
62	10,136	0,418	N
*63	31,806	0,486	N
64	33,357	0,404	N
65	10,548	0,431	N
66	19,774	0,384	N
67	13,403	0,516	H
68	36,502	0,531	H
*69	65,770	0,442	N
*70	40,248	0,384	N
*71	48,301	0,439	N
72	54,055	0,446	N
73	26,624	0,221	L
74	5,372	0,407	L
75	53,807	0,463	N
*76	62,909	0,443	N

77	27,050	0,537	H
78	35,163	0,526	H
79	59,260	0,503	H
80	20,527	0,552	H
81	26,777	0,569	H
82	60,721	0,490	H
83	16,246	0,471	H
84	10,7995	0,503	H

Usporedbom vrijednosti fluorescencije prikazanih u Tablici 5. s fluorescencijama za pripadajuće native uzorke plazme, razvidno je sljedeće: otkloni fluorescencije u uzorku suhe kapi krvi na filter papiru za uzorke za čiju je pripadajuću plazmu nativnog oblika izmjeren nizak otklon fluorescencije i izmjerena je normalna aktivnosti enzima, također prikazuju relativno nizak otklon fluorescencije. Ako izračunamo srednju vrijednost otklona fluorescencije za native uzorke plazme kod kojih je otklon  $< 100$  ( $n=66$ ), dobivamo srednju vrijednost otklona fluorescencije koja iznosi 42,868. Srednja vrijednost otklona fluorescencije uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru, za te iste uzorke iznosi 35,442. Razlika tih dviju srednjih vrijednosti iznosi 7,426 te se ne smatra značajnom i to nam ukazuje da se uzorci s niskim vrijednostima zaista mjere kao takvi. Međutim, činjenica da kod uzoraka kod kojih je u nativnom obliku plazme izmjeren visoki otklon fluorescencije ( $> 100$ ) odnosno uzorci kod kojih je izmjerena visoka aktivnost enzima u plazmi, a u istim tim uzorcima (označeni \* u Tablici 4) suhe kapi krvi na filter papiru nije izmjeren visok otklon fluorescencije ukazuje da nemožemo očekivati korelaciju između otklona fluorescencije za uzorke s visokim aktivnostima enzima, a sukladno tome nije moguće očekivati ni korelaciju između aktivnosti enzima za iste uzorke. Iz tog razloga aktivnost enzima u uzorcima suhe kapi krvi nije ni računata jer već na temelju otklona fluorescencije utvrđujemo da korelacija između rezultata ne postoji.

#### 4.4. Utjecaj hematokrita

S obzirom na poteškoće opisane u literaturi koje uzrokuje hematokrit za uzorak suhe kapi krvi na filter papiru, jedan od ciljeva rada je bio izmjeriti vrijednost hematokrita za svaki pojedini uzorak i vidjeti kakav je zaista njegov utjecaj na aktivnost hitotriozidaze. Hematokrit definiramo kao volumen eritrocita u jedinici pune krvi, te on kao takav određuje viskoznost krvi. Zbog toga je u skladu s literaturnim navodima očekivano da hematokrit ima utjecaj na

širenje pune krvi nakapane na karticu filter papira. Posljedično, smatra se da isječci od 3 mm uzorka koji su dio reakcijske smjese sadrže različitu količinu krvi/plazme. To se objašnjava na način da u trenutku kada krv kapne na filter papir ona se započinje radijalno širiti i zasićivati filter papir. Viskoznost krvi kontrolira koliko daleko će se krv širiti po filter papiru. Publicirani literaturni izvori (De Kessel, 2014) upućuju na činjenicu da je veza između veličine kapi na filter papiru i hematokrita obrnuto proporcionalna. Stoga za jednaki volumen svake kapi krvi ( 60  $\mu$ L) visoki hematokrit doprinosi nastanku suhe kapi krvi manjeg promjera na filter papiru, a niski hematokrit dovodi do nastanka veće suhe kapi krvi na filter papiru. Nadalje, kada se izbuši dio uzorka suhe kapi krvi koja je manjeg promjera (uzorak više vrijednosti hematokrita) on bi trebao sadržavati više krvi od izbušenog djelića uzorka većeg promjera (napravljenog od uzorka s nižom vrijednosti hematokrita) (Fan, 2012). Na taj način u reakcijskoj smjesi nije prisutna jednaka količina uzorka odnosno krvi što može imati utjecaj i na vrijednost analita koji se u uzorku mjeri.

Od 84 uzorka, u njih 39 izmjerena je snižena vrijednost hematokrita (L), u 35 izmjerena je vrijednost hematokrita unutar referentnog intervala (N), a u preostalih 10 izmjerena je povišena vrijednost hematokrita (H). S obzirom da razvijanje metode u suhoj kapi krvi nije bilo zadovoljavajuće, nismo bili u mogućnosti odrediti točne aktivnosti enzima u uzorku suhe kapi krvi, a samim time ni vidjeti utječe li hematokrit na izmjerene aktivnosti enzima.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Mjerenje hitotriozidaze u plazmi je klinički zadovoljavajući biomarker za praćenje tijeka liječenja bolesnika s Gaucherovom bolešću. Izuzetak su bolesnici s polimorfizmom G102S u genu za hitotriozidazu.
2. Mjerenje hitotriozidaze u plazmi opisanom „*in house*“ metodom dobar je biomarker za praćenje sijalidoze.
3. Prilikom pokušaja uvođenja metode za mjerenje aktivnosti enzima hitotriozidaze u uzorku suhe kapi krvi na filter papiru prema opisanim postupcima u publiciranoj literaturi, utvrdili smo da nedostaje opis nekih ključnih koraka u protokolu koji su nužni za dobivanje očekivanih rezultata. Iako smo u potpunosti slijedili publicirane protokole, nismo dobili zadovoljavajuće rezultate u svim očekivanim rasponima.
4. Optimirani su uvjeti za mjerenje hitotriozidaze u suhoj kapi krvi jedino u referentnom rasponu. Takva metoda nije primjenjiva u postavljanju dijagnoze kao niti za praćenje tijeka liječenja. Tome u prilog govori i činjenica da je zadnji publicirani rad vezan za mjerenje hitotriozidaze u suhoj kapi krvi na filter papiru objavljen 2014. godine. U PubMed bazi znanstvenih publiciranih radova nalazi se samo 7 radova, od kojih su 3 od iste grupe autora.
5. Zbog svega navedenog nije bilo moguće ispitati utjecaj hematokrita na izmjerene vrijednosti također nije bilo moguće odrediti ni uvidjeti slaže li se s pronađenim literaturnim navodima o toj temi.

## 6. LITERATURA

1. Aerts JMFG, Boot RG, Blommaert EFC, Renkema GH, van Weely S, Hollak CEM. Chitotriosidase: Applications and Features of the Enzyme. *Gaucher clinical perspectives*, 1999, 4-8.
2. Bargagli E, Bennett D, Maggiorelli C, Di Sipio P, Margollicci M, Bianchi N, Rottoli P. Human Chitotriosidase: a Sensitive Biomarker of Sarcoidosis. *J Clin Immunol*, 2013, 33, 264-270.
3. Bobillo Lobato J, Jimenez Hidalgo M, Jimenez Jimenez L M. Biomarkers in Lysosomal Storage Diseases. *Diseasea*, 2016, 4, 40.
4. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Gaucher and Niemann-Pick diseases- enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clin Chim Acta*, 2002, 317, 191-197.
5. Civallero G, Michelin K, de Mari J, Viapiana M, Burin M, Coelho J C, Giugliani R. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta* , 2006, 372, 98-102.
6. Cooper GM, Hausman RE. Stanica molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 423-425.
7. Daintith J. A Dictionary of Chemistry. Oxford, Oxford university press, 2008, str.69.
8. De Kesel PMM, Capiou S, Lambert EW, Stove CP. Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. *Bioanalysis*, 2014, 6 (14), 1871-1874.



9. Dried Blood Spot Technology,  
<http://www.spotonsciences.com/dbstechnology/>, pristupljeno 21.1.2017.
10. Elmonem MA, Ramadan DI, Issac MSM, Selim LA, Elkateb SM. Blood spot versus plasma chitotriosidase: Asystematic clinical comparison. *CLB*, 2014, 47, 38-43.
11. Fan L, A Lee J. Managing the effect of hematocrit on DBS analysis in a regulated enviroment. *Bioanalysis*, 2012, 4 (4), 345-347.
12. Fumić K. Laboratorijska dijagnostika lizosomskih bolesti nakupljanja: nove mogućnosti. *Paediatr Croat*, 2005, 49 (3), 199-201.
13. Fumić K, Barić I, Mrsić M, Maradin M. Lizosomske bolesti nakupljanja- suvremena dijagnostika i nove mogućnosti liječenja. *Paediatr Croat*, 2004, 48, 160-168.
14. Genetics home references: CHIT1 gene,  
<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CHIT1#conditions>, pristupljeno 1.11.2016.
15. Herrera D, Monaga M, Campos D, Pampín Y, González EC, Lavaut K. Ultramicro-fluorometric assay for the diagnosis of Gaucher disease in dried blood spots on filter paper. *J Neonatal Perinatal Med*, 2013, 6, 61-7.
16. Monokromator, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Monokromator>, pristupljeno 1.12.2016.
17. Mrsić M. Dijagnoza i liječenje Gaucherove bolesti. *Paediatr Croat*, 2005, 49 (3), 7-12.

18. Goldim MP, Garcia C, Castilhos C, Daitx V, Mezzalira J, Breier AC, Jaqueline Cè, Mello A, Andrade C, Sartori N, Coelho J. Screening of high-risk Gaucher disease patients in Brazil using miniaturized dried blood spots and leukocyte techniques. *Gene*, 2012, 508, 197-198.
19. Rodrigues MDB, Oliveira AC, Müller KB, Martins A, D'Almeida V. Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spots: A comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clin Chim Acta*, 2009, 406, 86-88.
20. Sažetak opisa svojstava lijeka,  
[http://www.ema.europa.eu/docs/hr\\_HR/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/000157/WC500024112.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_Product_Information/human/000157/WC500024112.pdf), pristupljeno 1.10.2016.
21. Sheehan D. Physical Biochemistry: Principles and Applications. Second Edition. ChichesterWiley- Blackwell, 2009, str. 53-69.
22. Stroppiano M, Calevo MG, Corsolini F, Cassanello M, Cassinerio E, Lanza F, Stroppiana G, Cappellini MD, Filocamo M. Validity of  $\beta$ -D-glucosidase activity measured in dried blood samples for detection of potential Gaucher disease patients. *CLB*, 2014, 47, 1293-6.
23. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str.534-537.
24. Wang Y, Zhang HW, Ye J, Qiu WJ, Han LS, Gu XF. Comparison and clinical application of two methods for determination of plasma chitotriosidase activity. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2012, 50, 834-8.
25. What is a Biomarker?, 2014, <http://www.news-medical.net/health/What-is-a-Biomarker.aspx>, pristupljeno 10.10.2016.

## 7. SAŽETAK/ SUMMARY

Nasljedni metabolički poremećaji su monogenske bolesti, kod kojih se kao posljedica mutacije gena javlja sinteza nefunkcionalnog enzima ili njegova nedostatna sinteza. Zbog toga može doći do nakupljanja supstrata ili jednog od međuprodukata metaboličkog puta. Lizosomske bolesti nakupljanja spadaju u skupinu nasljednih metaboličkih poremećaja. Gaucherova bolest je najčešća lizosomska bolest. Riječ je o sfingolipidozi uzrokovanoj deficijencijom lizosomalnog enzima  $\beta$ -glukocerebrozidaza. Kao rezultat nedostatka  $\beta$ -glukocerebrozidaze dolazi do akumulacije GBA supstrata, glukozilceramida, u lizosomima makrofaga te se tako formiraju Gaucherove stanice u kojima se nakuplja enzima hitotriozidaza. Također, smatra se korisnim biomarkerom u sarkoizodi, multiploj sklerozi i drugim patološkim stanjima.

U ovom diplomskom radu određivao se enzim hitotriozidaza u 84 uzorka plazme bolničkih pacijenata te suhekapi krvi na filter papiru. Usporedbom rezultata dobivenih u obje vrste uzorakacilj je bio razviti metodu za određivanje hitotriozidaze u suhoj kapi krvi na filter papiru jer ona kao uzorak ima veliki broj prednosti u odnosu na plazmu.

Nakon uspostavljanja zadovoljavajućih uvjeta mjerenja hitotriozidaze u suhoj kapi krvi na filter papiru i njezinim mjerenjem spektrofluorimetrijom, dobiveni otkloni fluorescencije pokazali su da korelacija između dobivenih rezultata u suhoj kapi krvi na filter papiru i rezultata u uzorcima plazme s povišenom aktivnosti ne postoji.

## SUMMARY

Hereditary disorders are monogenetic diseases. In this type of disease synthesis of disfunctional enzyme or lack of synthesised enzyme are caused by mutation of a gene. Moreover, those diseases can cause accumulation of certain substrates or intermediates of metabolic pathways. Lysosomal storage disorder is one of the types of this hereditary disorders. Most common one is called Gauche disease. It is a sphingolipidosis caused by the deficiency of glucocerebrosidase. Consequent accumulation of glucosylceramide inside the lysosomes of macrophages results in formation of so called Gaucher cells. Chitotriosidase (CT) is enzyme that can be determined as biomarker in patients with Gaucher disease because it accumulates in macrophages. Moreover, CT is also a useful biomarker in sarcoidosis, multiple sclerosis and samo other conditions.

In this work we carried out the analysis of 84 samples of plasma and dried blood spot. In both sample types we measured CT activity.. The goal was to develop a method for determination of CT in dried blood spot, which has many advantages compared to plasma samples.

Therefore, after we achieved appropriate conditions for CT determination in dried blood spot we measured CT activity in both samples for each patient using flourescence spectroscopy. Fluorescence readings showed no correlation among dried blood spot samples and plasma samples in which we expected high CT activity.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diplomski rad

### Klinička primjena mjerenja hitotriozidaze u plazmi i suhoj kapi krvi na filter papiru

Ines Fijan

#### SAŽETAK

Nasljedni metabolički poremećaji su monogenske bolesti, kod kojih se kao posljedica mutacije gena javlja sinteza nefunkcionalnog enzima ili njegova nedostatna sinteza. Zbog toga može doći do nakupljanja supstrata ili jednog od međuprodukata metaboličkog puta. Lizosomske bolesti nakupljanja spadaju u skupinu nasljednih metaboličkih poremećaja. Gaucherova bolest je najčešća lizosomska bolest. Riječ je o sfingolipidozi uzrokovanoj deficijencijom lizosomalnog enzima  $\beta$ -glukocerebrozidaza. Kao rezultat nedostatka  $\beta$ -glukocerebrozidaze dolazi do akumulacije glukozilceramida u lizosomima makrofaga te se tako formiraju Gaucherove stanice u kojima se nakuplja enzim hitotriozidaza. Stoga je hitotriozidaza biomarker koji se može određivati kod Gaucherovih bolesnika. Također smatra se korisnim biomarkerom i u sarkoidozi, multiploj sklerozi te drugim patološkim stanjima. U ovom diplomskom radu mjerila se aktivnost enzim hitotriozidaze u 84 uzorka plazme bolničkih pacijenata te suhe kapi krvi na filter papiru. Usporedbom rezultata dobivenih u obje vrste uzoraka cilj je bio razviti metodu za određivanje hitotriozidaze u suhoj kapi krvi na filter papiru jer ona kao uzorak ima veliki broj prednosti u odnosu na plazmu. Nakon uspostavljanja zadovoljavajućih uvjeta mjerenja hitotriozidaze u suhoj kapi krvi na filter papiru i njezinim mjerenjem spektrofotometrijom, dobiveni otkloni fluorescencije pokazali su da korelacija između dobivenih rezultata u suhoj kapi krvi na filter papiru i rezultata u uzorcima plazme s povišenom aktivnosti ne postoji.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 39 stranica, 13 grafičkih prikaza, 5 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Suha kap krvi na filter papiru, Gaucherova bolest, hitotriozidaza

Mentor: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc., Olga Gornik**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Siječanj, 2017.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of medical biochemistry and hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Clinical significance of chitotriosidase in plasma and dried blood spot

Ines Fijan

#### SUMMARY

Hereditary disorders are monogenetic diseases. In this type of disease synthesis of disfunctional enzyme or lack of synthesised enzyme are caused by mutation of a gene. Moreover, those diseases can cause accumulation of certain substrates or intermediates of metabolic pathways. Lysosomal storage disorder is one of the types of this hereditary disorders. Most common one is called Gaucher disease. It is a sphingolipidosis caused by the deficiency of glucocerebrosidase. Consequent accumulation of glucosylceramide inside the lysosomes of macrophages results in formation of so called Gaucher cells. Chitotriosidase (CT) is enzyme that can be determined as biomarker in patients with Gaucher disease because it accumulates in macrophages. Moreover, CT is also a useful biomarker in sarcoidosis, multiple sclerosis and same other conditions. In this work we carried out the analysis of 84 samples of plasma and dried blood spot. In both sample types we measured CT activity. The goal was to develop a method for determination of CT in dried blood spot, which has many advantages compared to plasma samples. Therefore, after we achieved appropriate conditions for CT determination in dried blood spot we measured CT activity in both samples for each patient using fluorescence spectroscopy. Fluorescence readings showed no correlation among dried blood spot samples and plasma samples in which we expected high CT activity.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 39 pages, 13 figures, 5 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Dried blood spot, Gaucher disease, chitotriosidase

Mentor: **Ksenija Fumić, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ksenija Fumić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Olga Gornik, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: January, 2017.